

3종 한약 처방 물 추출물과 황금 에탄올 추출물에 의한 자궁내막과 태반세포 기능조절 연구

¹산부인과, 건양대학교 의과대학, ²한약연구부, 한국한의학연구원
³명곡의과학연구소, 건양대학교 의과대학
박서예¹, 노의정¹, 서창섭², 이성기^{1,3}, 신현규²

ABSTRACT

A Study on the Regulation of Endometrial and Placental Cell Function by Water Extract of 3 Types of Herbal Medicines and Ethanol Extract on *Scutellariae Radix*

Seo-Ye Park¹, Eui-Jeong Noh¹, Chang-Seob Seo², Sung-Ki Lee^{1,3}, Hyeun-Kyoo Shin²

¹Dept. of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Konyang University

²Herbal Medicine Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine

³Myunggok Medical Research Institute, College of Medicine, Konyang University

Methods: We investigated the ability to induce decidualization of human endometrial stromal cells and invasive ability of human trophoblast cells by water extract of three types herbal medicines (*Dangguijakyak-san*, *Siryung-tang*, *Antae-eum*) and ethanol extract on *Scutellariae Radix*.

Results: In the process of decidualization of endometrial stromal cells, three herbal medicines including *Dangguijakyak-san*, *Siryung-tang*, and *Scutellariae Radix* increased the production of decidual markers such as prolactin (PRL) and insulin-like growth factor-binding protein 1 (IGFBP1). However, *Antae-eum* increased mRNA levels of PRL and IGFBP and secretion of IGFBP in decidual stromal cells, but not PRL. Four herbal medicines inhibited the invasion of trophoblast cells.

Conclusions: Four herbal medicines may play a role in implantation in women with reproductive failures. However, further studies are warranted to elucidate whether these medications are helpful in the maintenance of pregnancy.

Key Words: Endometrial Stromal Cell, Decidualization, Trophoblast, Invasion, Herbal Medicines, *Dangguijakyak-san*, *Siryung-tang*, *Antae-eum*, and *Scutellariae Radix*

본 연구는 한국한의학연구원 기관고유 사업인 한방의료기관 한약처방 안전성·유효성 구축 사업 (KSN2021310)과 한국연구재단 기초연구사업(NRF-2017R1A6A1A03015713) 으로 부터 지원 받았음.

Corresponding author(Sung-Ki Lee) : Dept. of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Konyang University, 58 Gwanjeodong-ro, Seo-gu, Daejeon

Tel : 042-600-8646 E-mail : sklee@kyuh.ac.kr

Corresponding author(Hyeun-Kyoo Shin) : Herbal Medicine Research Division, Korea Institute of Oriental Medicine, 1672 Yuseong-daero, Yuseong-gu, Daejeon

Tel : 042-868-9464 E-mail : hkshin@kiom.re.kr

I. 서 론

성공적인 임신을 위해서는 착상과 임신유지가 잘 이루어져야 한다. 전 세계 가임기 부부의 10-15% 정도가 불임으로 고통받고 있고¹⁾ 임신이 확인된 후에도 20-30%는 자연유산을 경험한다. 유산은 임신 20주 이전에 임신이 종결되는 것으로 정의되며 임신반응이 확인되는 시기를 전후로 유산이 많이 발생한다²⁾. 따라서 배아 착상에서부터 임신 초기에 발생하는 자궁 내 다양한 문제를 적절히 조절할 수 있다면 임신율을 향상시킬 수 있을 것이다. 임신을 위해서는 자궁 특히 자궁내막 세포가 건강하여 착상이 잘 이루어져야 한다. 자궁내막세포는 호르몬의 주기적 변화에 반응하여 주기적인 성장, 분화, 탈락을 반복한다³⁾.

에스트로겐과 프로게스테론과 같은 난소 스테로이드호르몬에 의해서 자궁내막 간질세포는 탈락막세포로 분화되어 배아가 착상하기 좋은 환경을 조성한다⁴⁾. 탈락막세포는 배아가 자궁내막에 침투할 수 있게 하며, 배아를 모체에 의한 면역학적 반응으로부터 보호하고, 태반 형성이전에 발달중인 배아에 대한 영양 지원을 제공한다⁴⁾. 착상기에 탈락막 형성 이상은 불임 및 유산의 원인이 됨에 따라 임신초기 탈락막화(decidualization)는 성공적인 배아 착상과 임신유지를 위해 필수적이다^{4,5)}. 탈락막 형성 동안 자궁내막 간질세포는 프로락틴(prolactin, PRL), 릴렉신(relaxin), 레닌(renin), 인슐린 유사 성장 인자 결합 단백질 1(Insulin-like growth factor-binding protein 1, IGFBP1)과 같은 탈락막 특이적 인자들을 발현한다⁶⁾,

PRL과 IGFBP1은 임신초기에 혈청 프로게스테론 수치가 상승함에 따라 급격하게 증가하며, 탈락막 세포의 표현형 마커로 사용된다⁷⁾.

또 포배로부터 분화된 영양막세포는 모체 자궁내막층으로 침윤하여 태아에게 영양을 공급하고 자궁 내 혈관이 확장되도록 변화를 유도하는데 기여한다^{8,9)}. 이처럼 영양막세포는 임신 성립과 유지에 중요한 역할을 한다. 영양막세포의 침습 과정의 조절 장애는 광범위한 임신 이상을 초래할 수 있다¹⁰⁾.

본 연구에서는 한의학 문헌에서 임신 유지를 도와주는 한약으로 알려진 안태음(*Antae-eum*), 당귀작약산(*Dangguijakyak-san*), 황금(*Scutellariae Radix*)과 유산 방지에 유효하다고 이미 발표된 시령탕(*Siryung-tang*; *Chai-ling-tang* in China) 4종을 선택하였다^{11,12)}. 이들 한약처방과 한약재를 자궁내막간질세포와 영양막세포에 처리하여 자궁내막의 탈락막화와 영양막세포의 침윤 능력 변화를 관찰하였다.

II. 재료 및 방법

1. 한 약

1) 약재 선정 및 추출물 제조

3종의 한약 처방인 당귀작약산(5.0 kg), 시령탕(4.0 kg) 및 안태음(5.0 kg)은 Table 1과 같이 배합한 후 물을 50.0 L, 40.0 L 및 50.0 L를 각각 넣어 100°C에서 2시간 동안 초고속 진공 저온 추출기(COSMOS-660, Kyungseo E&P, Incheon, Korea)를 이용하여 가압 추출하였다. 각 추출액은 동결건조기(PVTFD100, IlShinBioBase, Yangju, Korea)를 이용하여 1206.7 g(24.1%), 685.0 g

(17.1%) 및 1371.0 g(27.4%)의 파우더 시료로 제조하였다. 황금(3.0 kg)은 70% 에탄올 30.0 L를 이용하여 한약 처방 추출 과정과 동일하게 추출하여 816.0 g (27.2%)의 파우더 시료를 제조하였다.

2) 추 출

총 4종의 한약시료 중 당귀작약산, 시령탕, 안태음은 물에 녹였고 황금은 Dimethyl Sulfoxide(DMSO)에 녹여서 실험을 진행하였다. 1 g의 한약시료를 5 mL의 물이나 DMSO에 녹여서 200 mg/mL로 만들어서 사용하였다.

Table 1. Composition of Each Herbal Medicine Prescription

Herbs	Latin name	Scientific name	Dangguijakyak-san			Siryung-tang			Antae-eum			Scutellariae Radix (g)		
			(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	(g)	
당귀 (當歸)	<i>Angelica Gigantis Radix</i>	<i>Angelica gigas Nakai</i>	681.8											476.3
천궁 (川芎)	<i>Cindii Rhizoma</i>	<i>Cnidium officinale Mak.</i>	681.8											381.0
작약 (芍藥)	<i>Paeoniae Radix</i>	<i>Paeonia lactiflora Pall.</i>	909.1											476.3
숙지황 (熟地黃)	<i>Rehmanniae Radix Preparata</i>	<i>Rehmannia glutinosa Liboschitz ex Steudel</i>												476.3
백출 (白朮)	<i>Atractylodis Rhizoma Alba</i>	<i>Atractylodes japonica Koidz.</i>	909.1											952.5
부령 (茯苓)	<i>Poria Sclerotium</i>	<i>Poria cocos Wolf</i>	909.1											359.2
감초 (甘草)	<i>Glycyrrhizae Radix et Rhizoma</i>	<i>Glycyrrhiza uralensis Fischer</i>												359.2
인삼 (人蔘)	<i>Ginseng Radix</i>	<i>Panax ginseng C. A. Meyer</i>												287.6
시호 (柴胡)	<i>Bupleuri Radix</i>	<i>Bupleurum falcatum L.</i>												287.6
반하 (半夏)	<i>Pinelliae Tuber</i>	<i>Pinellia ternata Breit.</i>												767.0
황금 (黃芩)	<i>Scutellariae Radix</i>	<i>Scutellaria baicalensis Gerogi</i>												334.9
육계 (肉桂)	<i>Cinnamomi Cortex</i>	<i>Cinnamomum cassia Presl</i>												287.6
저령 (豬苓)	<i>Polyporus</i>	<i>Polyporus umbellatus Fries</i>												143.2
택사 (澤瀉)	<i>Alismatis Rhizoma</i>	<i>Alisma orientale Juzep.</i>												359.2
사인 (砂仁)	<i>Amomi Fructus</i>	<i>Amomum villosum Lour.</i>												622.6
진피 (陳皮)	<i>Citri Unshius Pericarpium</i>	<i>Citrus unshiu Mark.</i>												476.3
자소엽 (紫蘇葉)	<i>Perillae Folium</i>	<i>Perilla frutescens Britt.</i>												476.3
Total (g)			5000											5000
Yield of extract (%)			24.1											27.4
														3000
														27.2

2. 세 포

1) 세포주

자궁내막간질세포 세포주는 T-HESC를 사용하였으며 American Type Culture Collection(ATCC, USA)에서 구입하여 사용하였고 영양막세포의 세포주인 Swan 71(SW71) cell은 Gil Mor 교수(Wayne State University)로부터 제공받아서 실험에 사용하였다.

2) 시약 및 기기

세포독성을 측정하기 위해 WST assay kit(Cyto X; LPS solution, 한국)와 Epoch Microplate Spectrophotometer(BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)를 사용하였고 탈락막 표시인자를 측정하기 위해서 LightCycler 96 System real-time PCR machine(Roche, Basel, Switzerland)과 ELISA kit(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하였다. 영양막세포의 침습능력을 확인하기 위해 48-well Boyden chamber(Neuro Probe, Gaithersburg, MD)를 사용하였고 Diff-Quik kit(Sysmex, Kobe, Japan)를 이용하여 결과를 확인하였다.

3) 세포 배양

자궁내막간질세포의 세포주인 T-HESC는 phenol red가 없는 Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham(DMEM/F12) 배지에 10% fetal bovine serum(FBS)와 100 U/mL penicillin/streptomycin, 1% insulin-transferrin-selenium(ITS)+ Premix, 1 mM sodium pyruvate, L-glutamine을 첨가하여 배양하였고 37°C/5% CO₂에서 유지시켰다. 영양막세포의 세포주인 SW71 cell은 DMEM 배지에 10% FBS와 100 U/mL penicillin/streptomycin, 10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid(HEPES), 0.1 mM non-essential

amino acids(MEM), 1 mM sodium pyruvate를 첨가하여 37°C/5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

4) 시료 전처리

당귀작약산, 시령당, 안태음은 물에 녹였고 황금은 DMSO에 녹여서 실험을 진행하였다. 1 g의 한약시료를 5 mL의 물이나 DMSO에 녹여서 200 mg/mL로 만들어서 사용하였다.

5) 세포독성 측정

T-HESC를 6 well plate에 5×10⁵ cells/well 농도로 분주하여 estradiol(10 nM), progesterone(1 μM), cyclic adenosine monophosphate(cAMP)(500 μM) 그리고 한약을 농도 별로 5일 동안 처리하였고 3일째 되는 날에 새로운 배지로 바꾸고 배양하였다. 배양 후 WST assay kit를 200 μL씩 넣어주고 1시간 동안 반응 시킨 후 microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

SW71 cell에서 WST assay kit를 사용하여 한약 4종에 대한 세포독성을 확인하였다. 48 well plate에 2×10⁴ cells/well 농도로 분주하여 하루 동안 안정화 시간을 주었고 2% FBS 배지로 바꿔준 후 한약 4종을 다양한 농도별(0.1~50 mg/mL)로 각각 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 WST assay kit를 20 μL씩 넣어주고 30분 동안 반응 시킨 후 microplate reader를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

6) cAMP 농도에 따른 자궁내막간질세포(T-HESCs)의 탈락막화 변화 확인

T-HESC를 12 well plate에 1×10⁵ cells/well 농도로 분주하여 하루 동안 안정화 시간을 주었다. 탈락막화 과정에 필요한 호르몬 estradiol(10 nM), progesterone(1 μM)

과 cAMP를 농도별(0.5 μM ~500 μM)로 5일 동안 처리하였고 3일째 되는 날에 배지를 교체 해주었다. 5일째, 세포는 세포 독성 검사를 진행하였고 상층액은 모아서 ELISA로 PRL을 측정하였다.

7) 자궁내막간질세포에서 탈락막 표지인자 변화 확인

T-HESC를 6 well plate에 5×10^5 cells/well 농도로 분주하여 하루 동안 안정화 시간을 주었다. 그 후 새로운 배지로 바뀌준 후 estradiol(10 nM), progesterone(1 μM), cAMP(500 μM) 그리고 한약을 농도 별로 5일 동안 처리하였고 3일째 되는 날에 새로운 배지로 바뀌주었다. 세포에서는 PCR로, 상층액에서는 ELISA로 PRL과 IGFBP1의 발현량을 확인하였다.

8) 영양막세포의 침윤 변화 확인

Matrigel을 혈청이 없는 배지로 희석한 뒤 membrane에 10 mL씩 넣어주고 24시간 동안 4°C에서 coating 하였다. 코팅된 멤브레인은 24시간 동안 건조시켰다. 보이든 챔버의 위쪽 챔버에 혈청이 없는 배지 상태로 바뀌준 영양막세포를 4×10^5 cells/well 농도로 넣어주고 아래 챔버에는 10% FBS 배지로 희석한 한약을 농도별로 넣어주었다. 그리고 24시간 후 Diff-Quick kit로 멤브레인을 염색시켜 현미경으로 관찰하였다.

3. 통계분석

실험 결과에 대한 통계적 분석은 GraphPad Prism 버전 5.00(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)을 사용하여 수행하였다. 모든 측정 결과는 평균 \pm 표준 편차(SD)로 표시하였고 각 실험군 간의 차이는 $P < 0.05$ 일 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

III. 결 과

1. cAMP 농도에 따른 자궁내막간질세포의 탈락막화 변화

T-HESC에 탈락막화 과정에 필요한 호르몬 estradiol(10 nM), progesterone(1 μM)과 cAMP를 농도별(0.5 μM ~500 μM)로 5일간 처리하여 세포 독성을 확인해본 결과 모든 농도에서 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한 탈락막화 지표로 알려진 PRL이 500 μM cAMP 농도에서만 발현되고 이하 농도에서는 발현되지 않는 것을 확인하였다. 따라서 cAMP 농도를 PRL이 발현되는 500 μM 로 선정하여 실험을 진행하였다(Fig. 1).

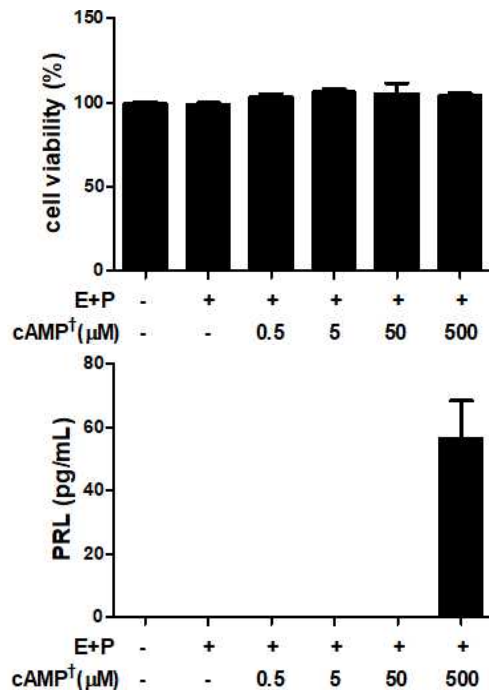


Fig. 1. Effects of cAMP concentration on decidualization of endometrial stromal cells. T-HESCs were treated with estradiol (10 nM), progesterone (1 μM), and various concentration cAMP for 5 days, and cell viability and PRL expression level confirmed using WST assay and ELISA (\dagger : cyclic adenosine monophosphate).

2. 자궁내막간질세포에서 cAMP와 한약 농도에 따른 독성 평가

T-HESC에 estradiol(10 nM), progesterone (1 μM), cAMP(500 μM) 그리고 당귀작약산, 시령탕, 안태음, 황금 등의 각각의 4

종 한약을 농도 별로 5일 동안 처리하였고 WST assay를 통해 세포의 생존 및 성장 저해를 측정하였다. 그 결과, 모든 조건에서 세포독성이 나타나지 않는 것을 확인하였다(Fig. 2).

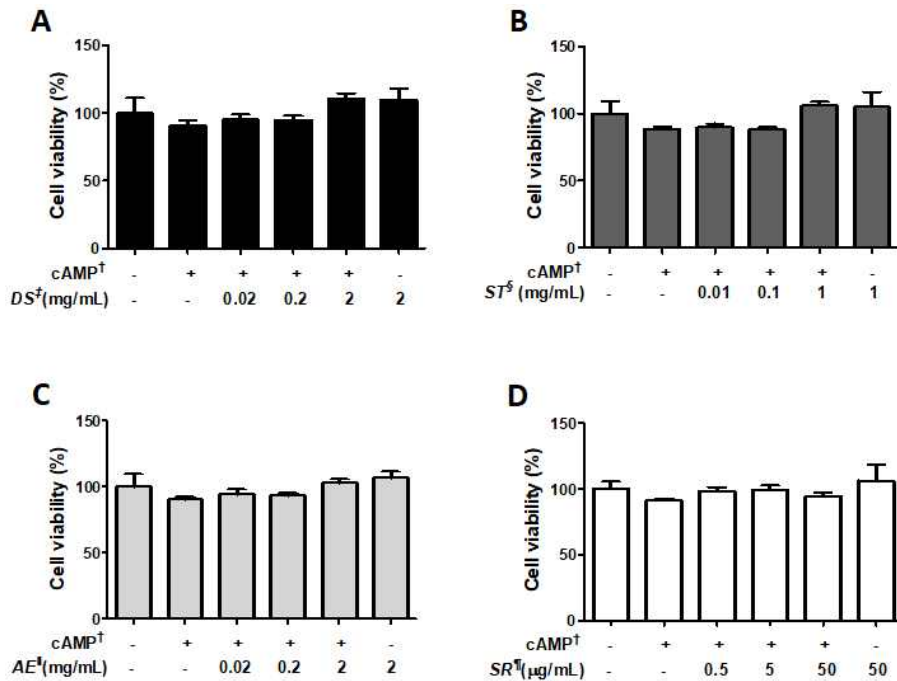


Fig. 2. Effects of cAMP and four herbal medicine on cell viability in endometrial stromal cells.

T-HESCs were treated with estradiol (10 nM), progesterone (1 μM), cAMP (500 μM), and indicated concentration herbal medicines for 5 days, and the survival and growth inhibition of cells were measured through WST assay (†: cyclic adenosine monophosphate, ‡: *Dangguijakyak-san*, §: *Siryung-tang*, ||: *Antae-eum*, ¶: *Scutellariae Radix*).

3. 자궁내막간질세포의 RNA 수준에서 4종 한약 처리에 따른 탈락막화 조절 능력 평가

T-HESC에 estradiol(10 nM), progesterone (1 μM), cAMP(500 μM) 그리고 당귀작약산, 시령탕, 안태음, 황금 등의 각각의 4종 한약을 농도 별로 5일 동안 처리하였

고 PRL과 IGFBP1의 발현 정도를 확인하기 위해 PCR로 측정하였다. RNA 수준에서 4종 한약 모두 cAMP만 처리하였을 때 보다 한약을 농도별로 함께 처리하였을 때 PRL과 IGFBP1이 유의하게 증가하였다(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)(Fig. 3).

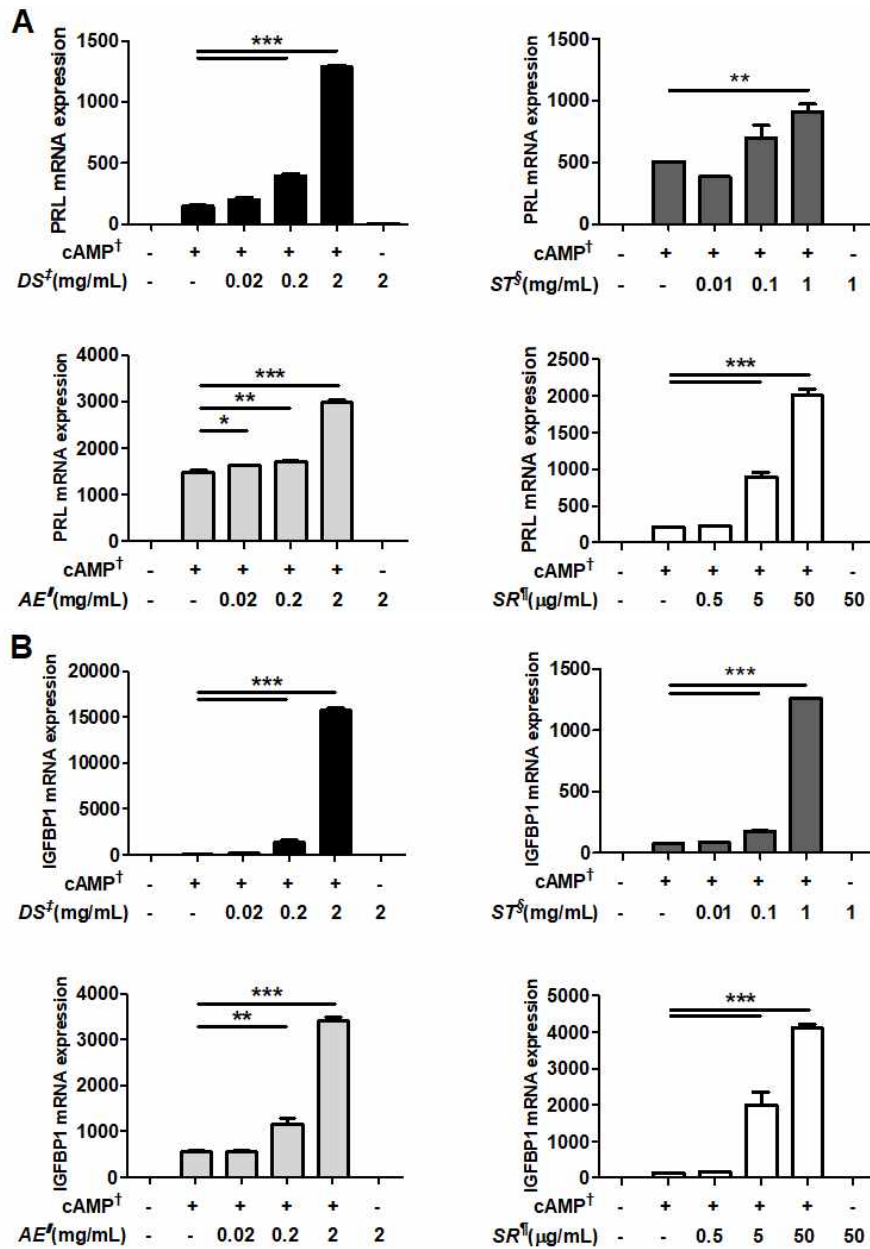


Fig. 3. Effects of four herbal medicine on decidualization control ability at the RNA level in the endometrial stromal cells.

T-HESCs were treated with estradiol (10 nM), progesterone (1 µM), cAMP (500 µM), and indicated concentration herbal medicines for 5 days, and expression level of PRL and IGFBP1 confirmed using PCR. (A) PRL, (B) IGFBP1 (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, †: cyclic adenosine monophosphate, ‡: *Dangguijakyak-san*, §: *Siryung-tang*, ||: *Antae-eum*, ¶: *Scutellariae Radix*).

4. 자궁내막간질세포의 단백질 수준에서 4종 한약 처리에 따른 탈락막화 조절 능력 평가

T-HESC에 estradiol(10 nM), progesterone (1 µM), cAMP(500 µM) 그리고 당귀작

약산, 시령탕, 안태음, 황금 등의 각각의 4종 한약을 농도 별로 5일 동안 처리하였고 PRL과 IGFBP1의 발현 정도를 ELISA로 측정하였다. 단백질 수준에서 PR의 발현이 당귀작약산, 시령탕, 황금을 처리했을

때는 증가되었고 안태음에서는 유의한 차이가 나지 않았다. IGFBP1 발현은 당귀, 작약산, 시령탕, 안태음, 황금을 처리했을 때

모두 유의하게 증가하였다(*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)(Fig. 4).

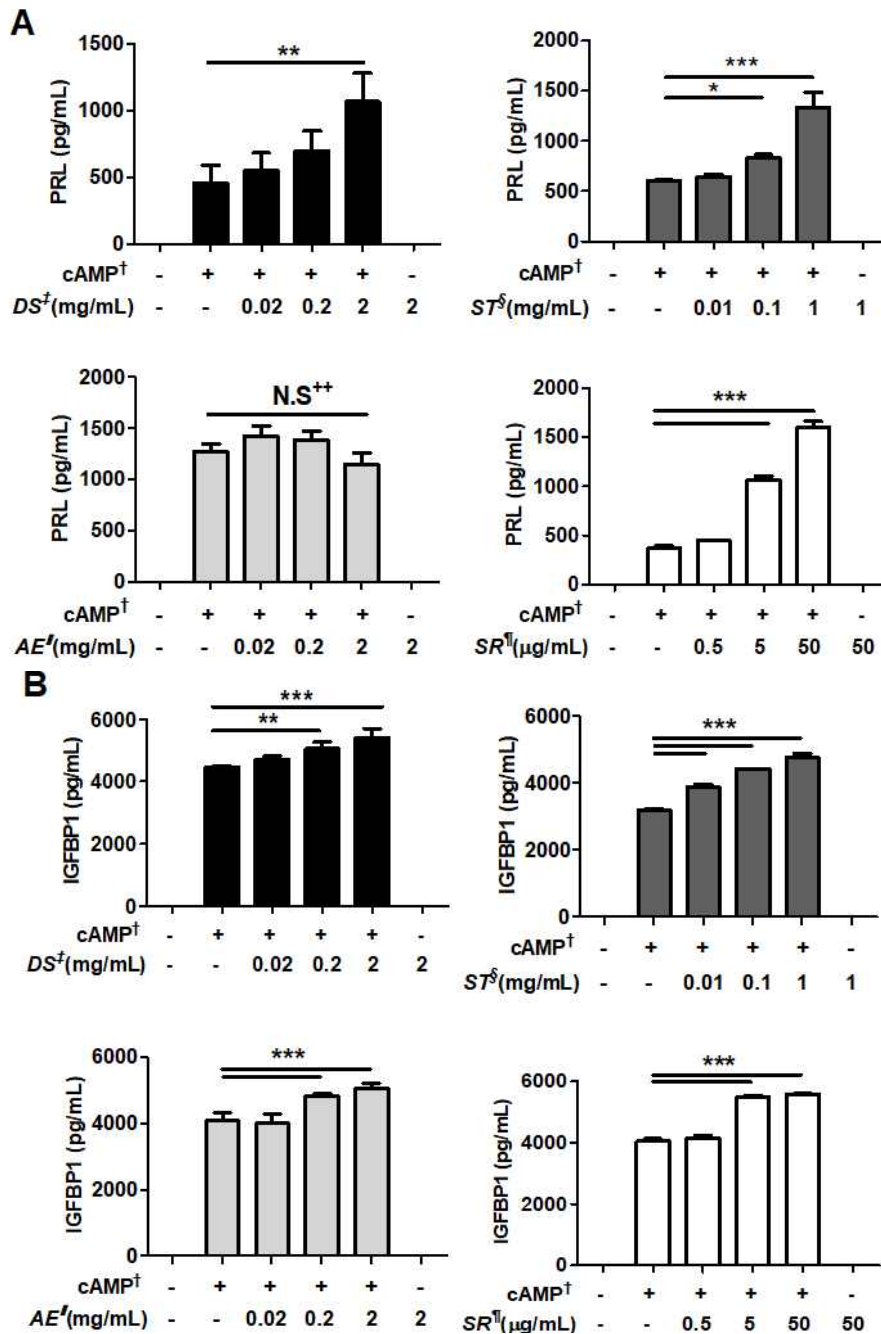


Fig. 4. Effects of four herbal medicine on decidualization control ability at the protein level in the endometrial stromal cells. T-HESCs were treated with estradiol (10 nM), progesterone (1 μM), cAMP (500 μM), and indicated concentration herbal medicines for 5 days, and expression level of PRL and IGFBP1 confirmed using ELISA. (A) PRL, (B) IGFBP1 (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ‡: *Danguijakyak-san*, §: *Siryung-tang*, ||: *Antae-eum*, ¶: *Scutellariae Radix*, ++: not significant).

5. 영양막세포에서 한약 농도에 따른 독성 평가

SW71 세포에 한약을 농도별로 처리하여 24시간 후 WST assay를 통해 세포의 생존 및 성장 저해를 측정하였다. 당귀작약산과 시령탕은 5 mg/mL에서는 독성

이 나타나지 않았고, 안태음은 2 mg/mL, 황금은 50 µg/mL까지 독성이 나타나지 않았다. 또한 당귀작약산과 시령탕은 10 mg/mL, 안태음은 5 mg/mL, 황금은 100 µg/mL부터 독성을 나타내었다 (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001)(Fig. 5).

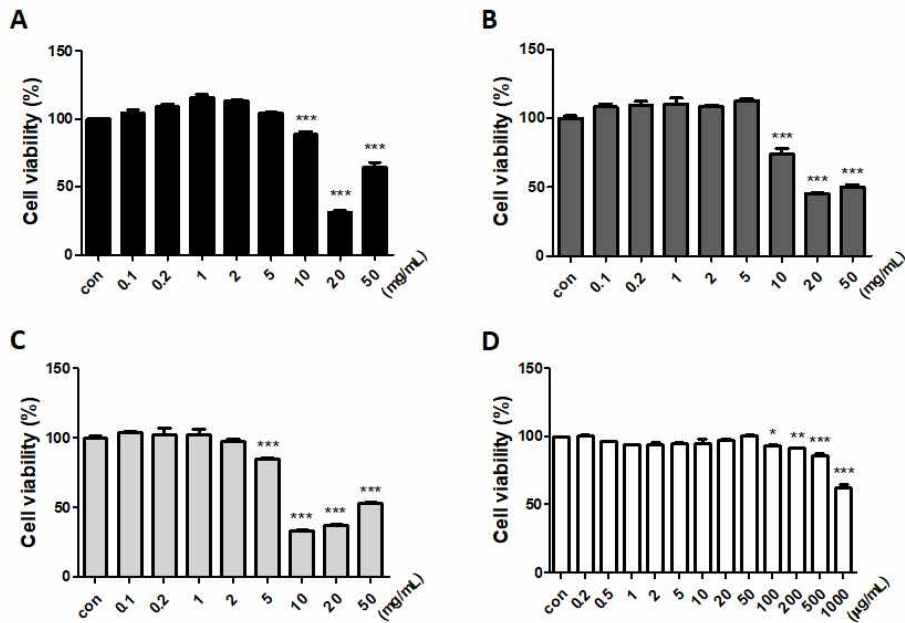


Fig. 5. Effects of four herbal medicine on cell viability in trophoblast cells. SW71 cells were treated with various concentration of herbal medicines for 24 hr, the survival and growth inhibition of cells were measured through WST assay. (A) *Dangguijakyak-san*, (B) *Siryung-tang*, (C) *Antae-eum*, (D) *Scutellariae Radix* (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001).

6. 4종 한약 처리에 따른 영양막세포의 침습능력 평가

SW71 cell에 4종 한약을 농도 별로 24 시간 처리하였고 한약에 따른 영양막세포의 침윤 변화를 확인하기 위해서 invasion

assay를 진행하였다. 당귀작약산, 시령탕, 안태음, 황금 등의 4종 모두 SW71 cell에 처리했을 때 영양막세포의 침윤이 유의하게 감소하였다(*P<0.05, ***P<0.001)(Fig. 6).

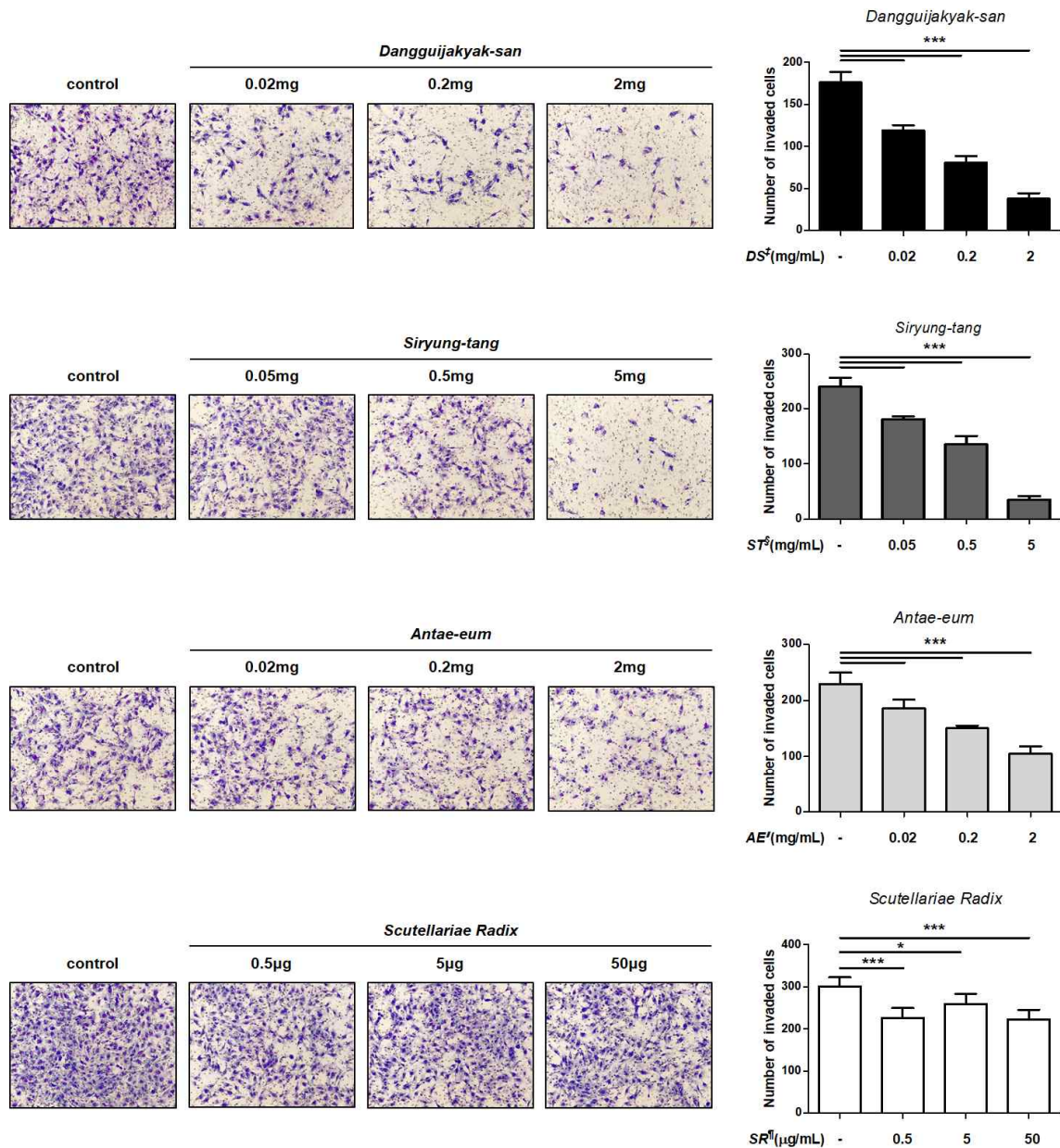


Fig. 6. Effects of four herbal medicine on invasive ability of trophoblast cells. SW71 cells were treated with indicated concentration of herbal medicines for 24 hr, and invasive ability of trophoblast cells were measured through invasion assay (*P<0.05, ***P<0.001, ‡: *Dangguijakyak-san*, §: *Siryung-tang*, ||: *Antae-eum*, ¶: *Scutellariae Radix*).

IV. 고찰

한의학에는 임신과 임신유지를 위하여 한약을 투여하거나 또는 특정 한약을 금기하는 기록이 있고, 현대에 들어와서 이에 대한 세포·동물 실험 및 임상 보고

를 통해 검증하고 있다. 본 연구에서는 이와 관련하여 문헌 및 선행연구가 이루어진 당귀작약산, 시령탕, 안태음 3종 한약 처방과 황금 1종을 이용하였다.

이들 4종 한약에 대한 임신 관련 사전 연구를 살펴보면, 당귀작약산은 정상 흰

취에 투여 시에 혈중 난포자극호르몬 (follicle-stimulating hormone, FSH), 황체화호르몬(luteinizing hormone, LH) 및 에스트로겐 수치 변화가 없으며, 배란기능 및 자궁내막세포 분화에도 영향을 주지 않았다¹³⁾. 시령탕은 자가 면역이상 유산 환자에게 투여하였을 때 T-bet mRNA 발현을 향상시켜 Th1 cytokines를 증가시킴으로써 Th1/Th2 균형을 이루게 하여 반복유산을 억제하는 효과가 있을 것으로 판단되었다¹²⁾. 한편 당귀작약산과 시령탕의 면역이상 유산 동물 모델 비교 연구에서, 유산율이 당귀작약산군 52.3%, 시령탕군 14.6%로 시령탕의 면역이상 유산 억제 효능이 검증되었으나, 혈중 Interleukin(IL)-4, Interleukin(IL)-23, Tumor Necrosis Factor(TNF)- α 지표 변화가 없어, 시령탕은 이러한 지표 조절이 아닌 다른 기전으로 유산 방지 효능이 있는 것으로 추측하였다¹⁴⁾. 안태음의 경우 생쥐에 배란 수정 및 착상기와 기관 발생기, 태아 성장 및 분만기 등에 나누어 투여한 결과, 임신기간 동안 태아 착상, 임신 유지 및 분만에 효과적이지 못하거나 오히려 억제 효과를 나타내어 임신 관련 투약 시에 신중해야한다고 보고하였다¹⁵⁾. 황금은 이 속에 포함된 여러 화합물 성분 들이 항염, 항산화, 항바이러스 및 심혈관계 작용 등이 있고¹⁶⁾, 이러한 복합적인 약리적 근거로 황금이 태동 불안에 대해 임신 유지 효능이 있다고 하였으나¹⁷⁾, 임신과 관련된 직접적인 약리 결과는 없다.

본 연구에서는 4종 한약이 임신과 임신유지 효과를 알기 위하여 자궁내막간질세포와 영양막세포의 세포주에서 세포독성과 탈락막화의 지표가 되는 PRL과

IGFBP1의 발현량 변화, 영양막세포의 침습 능력 변화를 확인하였다. 자궁내막의 탈락막화는 자궁내막간질세포가 형태학적 및 기능적으로 변화하는 과정을 의미하며 PRL과 IGFBP1과 같은 탈락막 특이인자 및 탈락 마커의 발현을 포함한다. 이 과정에서의 문제는 불임, 반복유산을 포함한 다양한 임신 장애를 초래한다⁴⁾.

자궁내막간질세포에 당귀작약산, 시령탕, 안태음, 황금을 농도별로 처리하였을 때 4종 한약 모두 cAMP만 처리하였을 때 보다 RNA 수준에서 PRL과 IGFBP1이 유의하게 증가하였다(Fig. 3). 단백질 수준에서는 자궁내막간질세포에 cAMP만 처리하였을 때 보다 당귀작약산, 시령탕, 황금을 처리했을 때 PRL의 발현이 유의하게 증가하였다. 그러나 자궁내막간질세포에서 PRL의 발현이 안태음을 처리했을 때는 유의하게 차이를 보이지 않았다. 또 다른 탈락막화 마커인 IGFBP1의 발현은 당귀작약산, 시령탕, 안태음, 황금 등 4종 한약을 농도별로 함께 처리하였을 때 모두 유의하게 증가하였다. 이는 이들 4종 한약이 자궁내막간질세포의 탈락막화를 촉진하는 효과가 있음을 시사한다(Fig. 4). 따라서 당귀작약산, 시령탕, 황금은 PRL과 IGFBP1 증가를 통해 자궁내막간질세포의 탈락막화를 촉진하며, 안태음은 앞서 언급한 세 가지 약재에 비해 다소 약한 탈락화를 유도하는 것으로 판단된다. 이와 같이 4종 한약에 의한 탈락막화 촉진은 배아의 착상을 도와 불임의 극복에 도움이 될 수 있으며 이는 초기 임신 성립에 긍정적으로 작용할 것으로 사료된다.

영양막세포는 태아에게 영양을 공급하고 태반을 구성하는 주된 세포이며 착상과 태반 형성에 중요한 역할을 한다^{7,18)}. 영

양막 침습 과정의 조절 장애는 광범위한 임신 이상을 초래할 수 있다. 지나치게 얇은 침습은 유산, 자간전증, 자궁내성장제한, 태반박리 및 자궁내사망을 포함한 산과 합병증을 유발할 수 있다. 대조적으로 너무 과도한 침습은 비정상적으로 깊은 자궁 태반 침윤을 초래하여 태반유착증후군을 일으킬 수 있다. 적절한 영양막 침범은 산모의 건강과 태아의 적절한 성장 및 발달에 가장 중요하다⁸⁾. 영양막세포에서 당귀작약산, 시령탕, 안태음, 황금 등 4종 한약을 처리하였을 때 4종 한약 모두에서 영양막세포의 침윤능력이 유의하게 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 6).

일반적으로 태반의 침윤이 적절히 일어날 때 앞에서 언급한 산과적 합병증이 감소한다. 태반의 침윤은 탈락막 세포 외에 다른 요소에 의해서도 조절된다. 예를 들어 자궁 내 자연살해세포에 의해서 태반침윤은 촉진된다. 그러므로 이들 4종의 한약에 의한 영양막세포의 탈락막 내 침윤 감소가 임신유지에 어떤 영향을 주는지는 동물실험 등을 통해 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결과적으로 당귀작약산, 시령탕, 황금은 자궁내막간질세포에서 탈락막화 지표가 되는 PRL과 IGFBP1의 생성을 유의하게 증가시켰고 영양막세포의 침습능력은 감소시켰다. 다만 안태음은 자궁내막간질세포에서 PRL과 IGFBP1의 생성을 RNA수준에서 유의하게 증가시켰으나 단백질 수준에서는 PRL 생성 증가하나 IGFBP1 생성에는 효과가 없었으며, 영양막세포 침습능력은 감소시켰다. 본 약재들이 임신에 긍정적인 효과를 보일 수 있다는 가능성은 본 연구를 통해 확인할

수 있었으나 장기적으로 임신에 도움을 주는지 확인하기 위해서는 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

1. 당귀작약산, 시령탕, 안태음 3종 처방은 자궁내막의 탈락막화 촉진시켜 착상과 초기임신 성립에 효과가 있을 것으로 사료된다.
2. 황금은 PRL과 IGFBP1의 생성은 유의하게 증가시켰고 영양막세포의 침습능력이 감소하여 착상과 초기임신 성립에 효과가 있을 것으로 사료된다.

Received : Jul 08, 2021

Revised : Jul 19, 2021

Accepted : Aug 27, 2021

References

1. Simionescu G, et al. The complex relationship between infertility and psychological distress(Review). *Exp Ther Med*. 2021;21(306):1-6.
2. Hwang HS, et al. Cytogenetic study in 535 couples with recurrent spontaneous abortions in Korea. *Kor J Fertil Steril*. 2005;32(2):113-9.
3. Gibson DA, et al. Endometrial Intracrinology-generation of an estrogen-dominated microenvironment in the secretory phase of women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(11):E1802-6.
4. Okada H, Tsuzuki T, Murata H. Decidualization of the human endometrium. *Reprod Med Biol*. 2018;17(3):220-7.

5. Huang J, et al. Protective role of GPR120 in the maintenance of pregnancy by promoting decidualization via regulation of glucose metabolism. *EBioMedicine*. 2019;39:540-51.
6. Kida N, et al. Exposure to cigarette smoke affects endometrial maturation including angiogenesis and decidualization. *Reprod Med Biol*. 2021;20(1):108-18.
7. Tseng L, et al. Effect of progestin, antiprogestin, and relaxin on the accumulation of prolactin and insulin-like growth factor-binding protein-1 messenger ribonucleic acid in human endometrial stromal cells. *Biol Reprod*. 1992;47(3):441-50.
8. Kim GJ. Role of trophoblast in implantation and placenta development. *Korean J Reprod Med*. 2010;37(3):181-9.
9. Salomon C, et al. The possible role of extravillous trophoblast-derived exosomes on the uterine spiral arterial remodeling under both normal and pathological conditions. *BioMed Res Int*. 2014;2014:1-10.
10. Zhu JY, Pang ZJ, Yu YH. Regulation of trophoblast invasion: The role of matrix metalloproteinases. *Rev Obstet Gynecol*. 2012;5(3-4):e137-43.
11. Kim E, Song K, Seong W. Study on frequency of herb-medicine used on the pregnant women. *J Oriental Chr Dis*. 1996;2(1):101-8.
12. Huang ZY, Li SW, Ma QH. Molecular mechanism of Chai-ling-tang in treatment of autoimmunity-related recurrent abortion. *Prog Mod Biomed*. 2008;8(2):2292-4.
13. Lee JJ, et al. Effect of Dangguijagyagsan on the ovulation in rat. *Trad Korean Med*. 2000;10(1):227-39.
14. Aizawa S, Hayakawa S. New therapeutic strategies and immunological analysis for miscarriage mouse model by alloimmunity(アロ免疫による流産マウスモデルに対する新たな治療戦略と免疫学的解析). *Japan J Clin Immunol*. 2012;35(4):344.
15. Chung HM, et al. Changes of reproductive functions in pregnant mice administrated *Kyoaekungkue-tang*, *Bojungyikki-tang*, *Kungso-san*, *Antae-eum*, *Antaegumchul-tang*. *J Korean Oriental Med*. 2000;21(30):166-73.
16. Lee KS, et al. Review of pharmacological effects of *Scutellaria Baicalensis* and its bioactive compounds. *Kor J Oriental Preventive Medical Society*. 2011;15(2):69-99.
17. Kim HS, Han HS, Lee YJ. A study on a morphological identification of *Scutellariae Radix*. *Kor J Herbology*. 2008;23(2):33-40.
18. Lunghi L, et al. Control of human trophoblast function. *Reprod Biol Endocrinol*. 2007;5(6):1-14.